PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes 6 : C12P 17/18 // (C12P 17/18, C12R 1:465)

A1

(11) Número de publicación internacional: **WO 97/19187**

(43) Fecha de publicación internacional: 29 de Mayo de 1997 (29.05.97)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00215

(22) Fecha de la presentación internacional: 15 de Noviembre de 1996 (15.11.96)

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9502300 23 de Noviembre de 1995 (23.11.95) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: ANTIBIOTICOS, S.A. [ES/ES]; Avenida de Burgos, 8-A, E-28036 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes *(sólo US)*: RODRIGUEZ OTERO, Carmelita [ES/ES]; Avenida de José Aguado, 34-5-5°A, E-24005 León (ES). MORENO VALLE, Miguel Angel [ES/ES]; Calle Juan de la Cosa, 3-6°-A, E-24009 León (ES). LOPEZ NIETO, Manuel Jesús [ES/ES]; Calle Marques de Santillana, 23, E-24010 León (ES). COLLADOS DE LA VIEJA, Alfonso Juan [ES/ES]; Calle Valcarcel, 3-3°C, E-24010 León (ES). VITALLER ALBA, Alejandro [ES/ES]; Calle Carmen, 3, E-24001 León (ES).

(74) Mandatario: ELZABURU MARQUEZ, Alberto; Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, Patente ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada
Con informe de búsqueda internacional.

(54) Title: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF CLAVULANIC ACID AND/OR SALTS THEREOF

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ACIDO CLAVULANICO Y/O SUS SALES

(57) Abstract

A batch fermentation is carried out continuously or semicontinuously using strains of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 or mutants thereof. The fermentation process is carried out with a strict control of the soluble phosphate in the medium, both at the beginning and throughout the process. As a carbon source, lipids, preferably triglycerides can be used. Substantial increases in the production of the antibiotic are obtained.

(57) Resumen

Se emplea una fermentación en lotes, en continuo o semi-continuo utilizando cepas de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 o sus mutantes. El procedimiento de fermentación se lleva a cabo con un control riguroso del fosfato soluble presente en el medio, tanto al inicio, como a lo largo del mismo. Como fuente de carbono pueden utilizarse lípidos, preferentemente triglicéridos. Se obtienen incrementos notables en la producción del antibiótico.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

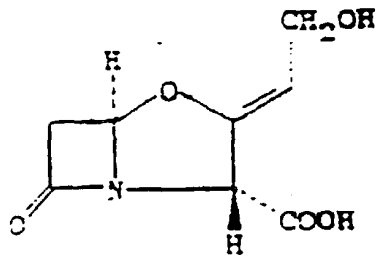
AM	Armenia	**GB**	Reino Unido	**MW**	Malawi
AT	Austria	**GE**	Georgia	**MX**	México
AU	Australia	**GN**	Guinea	**NE**	Níger
BB	Barbados	**GR**	Grecia	**NL**	Paises Bajos
BE	Bélgica	**HU**	Hungría	**NO**	Noruega
BF	Burkina Faso	**IE**	Irlanda	**NZ**	Nueva Zelandia
BG	Bulgaria	**IT**	Italia	**PL**	Polonia
BJ	Benin	**JP**	Japón	**PT**	Portugal
BR	Brasil	**KE**	Kenya	**RO**	Rumania
BY	Belarús	**KG**	Kirguistán	**RU**	Federación Rusa
CA	Canadá	**KP**	República Popular Democrática de Corea	**SD**	Sudán
CF	República Centroafricana			**SE**	Suecia
CG	Congo	**KR**	República de Corea	**SG**	Singapur
CH	Suiza	**KZ**	Kazajstán	**SI**	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Eslovaquia
CM	Camerún	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Senegal
CN	China	**LR**	Liberia	**SZ**	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	**LT**	Lituania	**TD**	Chad
CZ	República Checa	**LU**	Luxemburgo	**TG**	Togo
DE	Alemania	**LV**	Letonia	**TJ**	Tayikistán
DK	Dinamarca	**MC**	Mónaco	**TT**	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	**MD**	República de Moldova	**UA**	Ucrania
ES	España	**MG**	Madagascar	**UG**	Uganda
FI	Finlandia	**ML**	Mali	**US**	Estados Unidos de América
FR	Francia	**MN**	Mongolia	**UZ**	Uzbekistán
GA	Gabón	**MR**	Mauritania	**VN**	Viet Nam

PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ACIDO CLAVULANICO Y/O SUS SALES

Se describe un procedimiento para la producción de ácido clavulánico y/o sus sales mediante una fermentación con cepas seleccionadas de *Streptomyces clavuligerus* con un control riguroso de la concentración de fosfato soluble presente durante la misma y con la utilización opcional de fuentes de carbono como los lípidos, preferentemente triglicéridos.

Estado de la técnica

El ácido clavulánico es una molécula de fórmula



cuya utilidad estriba en su capacidad para inhibir las enzimas denominadas betalactamasas, que poseen algunos gérmenes patógenos Gram positivos y Gram negativos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, etc. y que debido a su acción les confiere resistencia a algunos antibióticos betalactámicos. Por ello, el ácido clavulánico mezclado con dichos antibióticos aumenta su espectro antibacteriano.

La producción de ácido clavulánico se sabe que la efectúan varias cepas pertenecientes al género *Streptomyces*, como por ejemplo *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *Streptomyces jumonjinensis* NRRL 5741, etc.

Como ha quedado ya expuesto en anteriores patentes (Patente Europea 0182522B1), la producción de ácido clavulánico puede incrementarse en la fermentación en lotes (batch) cuando una fuente de Carbono asimilable, como por ejemplo la glicerina, o la maltosa, es añadida también duran-

te la fermentación en lugar de ser añadida solo inicialmente. Sin embargo este incremento de producción así obtenido es bastante bajo. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es conseguir un proceso de obtención de ácido clavulánico y/o sus sales con una producción claramente mayor que la obtenida por los procedimientos conocidos en el Estado de la Técnica.

Muchos autores han puesto en evidencia el efecto inhibidor del fosfato sobre la producción de antibióticos (Martín, J. F., 1977, Adv. Biochem. Eng. 6:105-127). Concretamente se ha encontrado una inhibición del fosfato sobre la síntesis de cefalosporinas por *Streptomyces clavuligerus* (Lübbe, C. y col. 1985, Arch. Microbiol. 140:317-320 y Lübbe, C. y col. 1984, FEMS Microbiol. Lett. 25:75-79; Aharonowithz, Y. y col. 1977, Arch. Microbiol. 115:169-173; Jhang, J. y col. 1989, FEMS, 57:145-150), y también un efecto inhibidor del fosfato sobre la síntesis de ácido clavulánico por dicho microorganismo (Lebrihi, A. y col. 1987, Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:130-135; Romero, J. y col. 1984, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:318-325). Sin embargo, contrariamente a lo expuesto en las citas anteriores, hemos encontrado sorprendentemente más que un efecto negativo del fosfato sobre la producción de ácido clavulánico, un incremento sustancial en la producción de ácido clavulánico y/o sus sales, cuando el nivel de fosfato soluble en el medio de cultivo alcanza un rango óptimo y es mantenido en dicho rango. Más aún, hemos encontrado que un control estricto de la concentración de fosfato soluble en el medio de cultivo tiene una influencia mayor sobre el incremento de producción del sistema que la propia adición de nutrientes. Se ha utilizado un cultivo de *Streptomyces clavuligerus* en lotes (batch) o en semi-continuo (fed-batch) para la producción de ácido clavulánico así como otros antibióticos o moléculas típicas del metabolismo secundario. A los efectos de esta memoria, el término cultivo en lotes (batch) indica una fermentación donde los nutrientes son introducidos en el medio de cultivo sólo inicialmente y el caldo es extraído del tanque de fermentación sólo al final

del proceso. El término cultivo semi-continuo (fed-batch) implica una fermentación donde los nutrientes son introducidos en el medio de cultivo no sólo inicialmente sino también a lo largo de la fermentación, y el caldo es extraído del tanque de fermentación sólo al final del proceso. El proceso de producción del ácido clavulánico en batch o en fed-batch, presenta unas particularidades de fermentación de forma que se produce inicialmente un incremento notable de la viscosidad con la consecuente dificultad de mantener un nivel de oxígeno disuelto aceptable para prolongar la fase de producción durante períodos de tiempo más largos. Consecuentemente, se produce una fragmentación del micelio, la disminución de la viscosidad y la reducción de la producción, siendo inevitable la finalización del proceso.

El cultivo continuo es aplicado preferentemente para la obtención de biomasa, aminoácidos y otros metabolitos primarios. (Hospodka, J. 1966, Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms, pp 493-645; Malek, J and Fencl, Z. eds. Academic Press New York). Sin embargo, no se ha descrito de forma efectiva la utilización de un cultivo continuo para la obtención de metabolitos secundarios (antibióticos), o se ha realizado con escasa efectividad (Vu-Trong, K. and Grey, 1982 Biotechnol. Bioengineering 24: 1093-1103; Trangott C.S. et al 1993 Apol. Microbiol. Biotechnol. 39:433-437; Noack. D. 1988, J. Bas. Microbiol. 28:101-106). A los efectos de la presente memoria, el término cultivo en continuo implica una fermentación donde los nutrientes son introducidos en el medio de cultivo tanto al inicio como a lo largo de la fermentación y algunas porciones de caldo son extraídas del tanque de fermentación a lo largo de la misma y no sólo al final de ésta. Hemos encontrado ahora, añadiendo fosfato soluble al medio de cultivo y/o controlando y fijando su concentración a lo largo de la fermentación, que es posible y ventajoso obtener ácido clavulánico y/o sus sales en cultivo continuo con una alta producción. En el procedimiento en continuo, mediante la dilución apropiada del cultivo, a lo largo del proceso se va reduciendo la vis-

cosidad, lo que permite mantener la concentración de oxígeno disuelto (>40%), durante períodos de tiempo más largos, sin incremento de la agitación, evitando la fragmentación del micelio y manteniendo el período productivo del ácido clavulánico. Como consecuencia de la adición de nutrientes y agua se alcanza el llenado completo del volumen instalado lo que requiere la extracción continua del caldo a lo largo del proceso de fermentación, bien de forma intermitente, o bien de forma continua, para mantener el volumen de trabajo adecuado. De esta forma, y controlando el proceso por la adición de fosfato soluble al medio de cultivo durante todo el proceso, se consigue alargar el ciclo de fermentación y aumentar la producción total alcanzada, incrementando a su vez el rendimiento de producción por volumen geométrico instalado.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso de producción de ácido clavulánico y/o sus sales, mediante el cultivo de cepas seleccionadas de Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 y/o sus mutantes, en fermentación sumergida con aireación y agitación, en cultivo en lotes, semi-continuo o en continuo, donde la concentración de fosfato soluble presente en el medio de cultivo inicialmente y a lo largo de la fermentación, es fijada y/o mantenida dentro de unos rangos determinados, dependiendo de cada tipo de cultivo empleado, 500-4000 mg/l al principio de la fermentación en el cultivo en lotes (batch), o, en el caso de cultivo en semi-continuo (fed-batch) o continuo, entre 150-600 mg/l al comienzo de la fermentación y entre 20-150 mg/l a lo largo de la misma.

El proceso para la producción de ácido clavulánico y/o sus sales de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en presencia de fuentes de C y de N asimilables, y de, opcionalmente, sales minerales. La fermentación se lleva a cabo en condiciones aeróbicas, y en cultivo sumergido.

La temperatura óptima de fermentación se encuentra preferentemente entre 20°C y 40°C, particularmente entre 22°C y 30°C.

Las fuentes de C se pueden añadir como nutrientes sencillos, o complejos, sólo inicialmente (en el caso de un cultivo en lotes o batch), o a lo largo de la fermentación mediante adiciones intermitentes o continuas, en el caso de cultivo semicontínuo (fed-batch) o continuo, respectivamente. Dependiendo de la cepa usada, estas fuentes de C incluyen los hidratos de C (dextrinas, almidones, maltosa, etc.), polioles como el glicerol, por ejemplo, lípidos (fundamentalmente triglicéridos, ya sean naturales o sintéticos) y, en general cualquier otra fuente de C que permita el crecimiento de microorganismos. Hemos encontrado en concreto que los lípidos y más especialmente los triglicéridos naturales o sintéticos, pueden considerarse como una de las fuentes preferidas para llevar a cabo el proceso de la invención, mientras que en el Estado de la Técnica no existen referencias en este sentido De hecho, hemos encontrado que, usando tales fuentes de carbono, incluso sólo mediante una adición inicial única en el medio de cultivo (cultivo en lotes), la producción de ácido clavulánico y/o sus sales puede ser notoriamente incrementada simplemente cuidando que la concentración de fosfato soluble permanezca dentro de los límites definidos en la presente invención.

El medio de cultivo debe llevar también una fuente asimilable de N, orgánico o inorgánico, como por ejemplo harina de soja, líquidos de maceración del maíz, destilados solubles, extractos de levadura, harina de algodón, peptona, caseína o sulfato amónico.

También pueden ser incorporadas al medio de cultivo diversas sales minerales, como sodio, potasio, amonio, hierro, calcio, magnesio, cloruros, sulfatos y fosfatos.

La concentración de ácido clavulánico se puede determinar microbiológicamente empleando un germen productor de betalactamasa, como por ejemplo *Klebsiella aerogenes*, aunque es preferible la determinación mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución.

La extracción de ácido clavulánico o sus sales del caldo, se puede efectuar en la forma en que se extraen

otros antibióticos, en concreto, otras betalactamas, empleando resinas intercambiadoras de iones o disolventes, o cualquier otro de los métodos convencionales conocidos.

El fosfato soluble del medio inicial se puede determinar por un procedimiento sencillo y rápido, por ejemplo mediante kit comercial (Boehringer Mannheim Automated Analysis for BM/Hitachi System 704). El principio del método es la reacción de fósforo inorgánico con molibdato amónico. Este fósforo inorgánico se expresa después como fosfato. Para analizar el fosfato soluble la muestra (tomada homogéneamente del caldo de cultivo) debe ser filtrada previamente por un filtro Millipore de 0.45 μm de tamaño de poro o similar, para eliminar los sólidos. Esta muestra debe ser tomada después de la esterilización del medio de cultivo, puesto que la concentración de fosfato soluble puede fluctuar de acuerdo con el proceso de esterilización. Las muestras también pueden ser tomadas a lo largo del proceso de fermentación.

La valoración de fosfato total se lleva a cabo tomando 1 ml de caldo total y añadiendo 1 ml de ácido sulfúrico y 5 ml de ácido nítrico. Esta solución se evapora por calentamiento hasta tener un volumen final de 1 ml de una solución transparente. Este volumen final se lleva a 25 ml con agua destilada, y se valora por el método previamente citado de fosfato soluble.

Cuando la fermentación se realiza en lotes se ha encontrado que el nivel óptimo de fosfato soluble al comienzo de la fermentación debe encontrarse entre 500 y 4000 mg/l, preferiblemente entre 800 y 1600 mg/l.

Si debido a la naturaleza de las materias primas utilizadas, y a su concentración, el nivel de fosfato soluble está muy por encima o por debajo de estos límites debe corregirse. Para ello, cuando el nivel está por debajo del límite inferior, se puede adicionar antes o después de la esterilización, más fosfato inorgánico, por ejemplo bajo la forma de sal de potasio o de sodio, hasta alcanzar el nivel deseado. O bien puede hacerse precipitar parte del fosfato soluble, si su nivel es muy elevado, por la adición de cualquier precipi-

tante, por ejemplo mediante un compuesto de calcio, tal como un hidróxido o un acetato cálcico, o por cualquier otro sistema que garantice este objetivo.

Según la presente invención, se ha observado un incremento en la producción de hasta 5 veces más sobre un sistema de fermentación sin control del fosfato soluble inicial en el medio de cultivo en lotes. En la Tabla I se muestran los resultados de varias fermentaciones realizadas con el nivel óptimo de fosfato soluble, y fuera de él.

T A B L A I

Fermentación nº	Fosfato soluble mg/l	A. clavulánico 72 h		96 h	
		µg/ml	%	µg/ml	%
1 (comparativo)	18	311	100	420	100
2 (comparativo)	100	560	180	790	188
3	900	1410	453	2210	526
4	1580	1550	495	2240	533
5	3000	1410	453	1750	416
6 (comparativo)	7000	410	131	780	186

Por porcentaje de incremento (%) se entiende la producción de ácido clavulánico y/o sus sales, expresada como el resultado de multiplicar el valor final en µg/ml por 100, y dividir esta cifra por 311 (en el caso de una incubación de 72h) o por 420 (a las 96h), que representan los resultados de la fermentación cuyos niveles de fosfato soluble se encuentran fuera del rango óptimo.

Este fosfato debe estar soluble en el caldo de fermentación, como queda reflejado en los siguientes resultados de la Tabla II, en los que niveles semejantes de fosfato total conducen a fermentaciones con resultados muy dispares, dependiendo de que el fosfato soluble esté o no dentro de los límites óptimos.

TABLA II

Fermentación nº	Fosfato soluble mg/l	Fosfato total mg/l	A. clavulánico µg/ml (96 h)
4	1580	2380	2240
7 comparativo	230	2265	920

La diferencia de crecimiento del microorganismo para distintos niveles de fosfato no parece ser responsable de la diferencia de producción, al menos como principal factor. En la Tabla III se puede observar que existen diferentes niveles de producción para crecimientos similares, por lo que de nuevo aparece el nivel de fosfato como causa del incremento de producción. El volumen micelial se ha determinado en una centrífuga a 2500 g durante 10 minutos. (g significa fuerza de gravedad).

TABLA III

Fermentación nº	Fosfato soluble mg/l	% Vol micelial 72h	% Vol micelial 96h	A.clavulánico 72h µg/ml	A.clavulánico 96h µg/ml
1 (comparativo)	18	23	22	311	420
2 (comparativo)	100	22	22	560	790
3	900	30	30	1410	2210
4	1580	30	30	1550	2240
5	3000	30	30	1410	1750
6 (comparativo)	7000	27	28	410	780

Durante el período de fermentación se puede realizar un proceso de adición en fed-batch de fosfato, al igual que del resto de nutrientes, distribuido a lo largo de toda la fermentación. Se ha encontrado que el nivel óptimo de fosfato soluble total (inicial + añadido) es ligeramente inferior al nivel en batch, situándose entre 400 y 2000 mg/l.

Este aporte debe realizarse de forma que el nivel inicial esté entre 150 y 600 mg/l, y que el nivel de fosfato soluble a lo largo de la fermentación esté entre 20 y 150

mg/l. Para ello, es adecuado proceder a hacer aporte de ión fosfato soluble, o cualquier compuesto de calcio precipitante, como en el caso de la fermentación en batch, según que se requiera respectivamente, subir o bajar el nivel de fosfato para mantenerlo dentro de los límites señalados. En la Tabla IV se muestran los resultados de varias fermentaciones en semi-continuo realizadas con distintas concentraciones de fosfato soluble inicial y en adiciones.

Puede observarse que la cantidad total de fosfato adicionado es considerablemente más alta, sin merma de la producción, cuando dicha adición se hace a lo largo de la fermentación en vez de inicialmente. Todas las pruebas realizadas mantuvieron la concentración de fosfato soluble a lo largo de la fermentación en el nivel indicado, excepto las fermentaciones n° 8, 9 y 10, cuyo nivel fue inferior al requerido, y la n° 16 cuyo nivel fue superior.

T A B L A IV

Fermentación	FOSFATO SOLUBLE (mg/l)		ACIDO CLAVULANICO	
	Concentración	Total		
n°	Inicial	Adicionado	µg/ml	%
8	80	0	990	33
9	265	0	1230	41
10	520	0	2400	80
11	990	0	2080	69
12	1530	0	1920	64
13	228	618	3000	100
14	510	570	4020	134
15	722	594	3270	109
16	950	603	2730	91
17	278	1710	3600	120
18	230	2280	3360	112

En el cultivo en continuo, mediante la dilución apropiada del cultivo, a lo largo del proceso se va reduciendo la viscosidad, lo que permite mantener la concentración de oxígeno disuelto (>40%), durante períodos de tiempo más lar-

gos, sin incremento de la agitación, evitando la fragmentación del micelio y manteniendo el período productivo del ácido clavulánico. Como consecuencia de la adición de nutrientes y agua se alcanza el llenado completo del volumen instalado lo que requiere la extracción continua del caldo para mantener el volumen de trabajo adecuado. De esta forma, y controlando el proceso por la adición de fosfato soluble al medio de cultivo durante todo el proceso, se consigue alargar el ciclo de fermentación y aumentar la producción total alcanzada, incrementando, a su vez, el rendimiento de producción por volumen geométrico instalado.

En el cultivo en continuo se realiza, como en los casos anteriores, en lotes y en semi-continuo, una adición inicial de fosfato soluble. Tal adición es generalmente inferior a la de los cultivos en lotes y en semi-continuo, y es del orden de los 150 a 600 mg/l, preferentemente 200 a 400 mg/l iniciales, manteniendo un nivel posterior en el caldo del mismo orden, 20 - 150 mg/l durante más tiempo (50 - 100 horas).

En el cultivo en continuo, como en la fermentación en lotes o en semi-continuo, se realizan aportes de sales de fosfato soluble o compuestos de calcio u otros secuestrantes eficientes, para establecer las concentraciones iniciales requeridas en cada caso y mantener la concentración deseada durante la fermentación. La adición de sales de fosfato soluble total es similar o ligeramente superior a la utilizada en el cultivo en semi-continuo.

Se procede además a la adición de agua al medio de cultivo desde las 32 horas, con objeto de mantener la viscosidad del caldo en valores inferiores a 700 cp., lo que permite un incremento de la cantidad de nutrientes adicionados en los sistemas tradicionales, manteniendo el nivel de oxígeno disuelto mayor del 40% y prolongar la producción de ácido clavulánico hasta las 150 - 170 horas.

Durante el proceso completo se alcanza generalmente una dilución total de 1.5 a 1.6 frente a 0.9 a 1.1 de los cultivos tradicionales, rentabilizando el volumen geomé-

trico instalado. El proceso se realiza mediante la adición continua de nutrientes al medio inicial a lo largo de la fermentación. Estos nutrientes son fundamentalmente la fuente carbonada. Desde las 100 horas, se procede a la extracción continua o intermitente del caldo en una proporción del 2,5 al 14% del volumen del fermentador por día, con objeto de mantener el volumen constante y la viscosidad del medio inferior a 700 cP. El proceso puede prolongarse hasta las 160 - 170 horas.

En la Tabla V se reproducen los ejemplos 19-25, con cultivos en fed-batch y en continuo, con diferentes nutrientes y distintos niveles o aportes de fosfato soluble.

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

TABLA V

Nº	FERMEN-TACION	EDAD (h)	FOSFATO SOLUBLE mg/l INICIAL	FOSFATO SOLUBLE mg/l ADICION	ADICION NUTRIENTES	DILUCION	EXTRACCION 100 h. %DIA (V.D.E.)	CLAVULA-NICO µg/ml	ACTIVIDAD K/m³g
19	Semicon-tinuo	132	150	720	Welchol-92	0,96	- - - -	3150	1,63
20	"	135	241	550	Ac. de soja	1,10	- - - -	3710	2,20
21	Continuo	172	495	625	Priol.+glicerol	1,32	2,5%	3890	2,77
22	"	150	475	1080	"	1,40	9%	2445	1,85
23	"	172	500	1120	"	1,61	14%	2870	2,49
24	"	155	445	1145	"	1,57	14%	2680	2,27
25	"	150	260	1560	Priolube	1,42	9%	2660	2,06

WELCHOL 92®, Triglicérido Sintético
INDUSTRIA QUIMICA LASSEM

PRIOLUBE®, Trioleato de glicerol
UNICHENTA (HOLANDA)

V.D.E., Volumen Después de Esterilización

A modo de ilustración se describen los siguientes ejemplos:

E J E M P L O 1 (Comparativo)

Se prepara un medio de inóculo con la siguiente composición:

- Harina de pescado	-	2	g
- Glicerina	-	1.5	g
- Almidón soluble	-	1.5	g
- Carbonato cálcico	-	0.2	g
- Agua destilada	c.s.p.	100	ml

Se ajusta el pH a 6.7 y se reparte el medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml a razón de 40 ml. Se tapan éstos y se esterilizan a 121°C durante 20 minutos.

El medio así preparado se siembra con una suspensión de esporas de una cepa mutante superproductora de ácido clavulánico obtenida mediante un paso de mutación de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 con N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina y varios pasos de mutación con luz ultravioleta. Esta suspensión se prepara a partir de un tubo inclinado o una placa, con un medio nutritivo capaz de permitir el crecimiento y la esporulación.

Después de sembrado el medio se incuba durante 2 días a 25°C en un agitador rotatorio de 5 cm de excentricidad a 250 rpm.

Este cultivo así preparado se emplea para sembrar al 5% un medio de fermentación con la siguiente composición:

- Harina de soja	-	4	g
- Dextrina de maíz	-	1	g
- Buffer MOPS (ácido 3-[N-morfolin]propano-sulfónico)	-	1	g
- Cloruro de calcio	-	10	mg
- Cloruro sódico	-	10	mg
- Cloruro de magnesio	-	10	mg
- Acetato sódico	-	0.1	g

- Aceite de soja - 2 g
- Agua destilada c.s.p. 100 ml

Se ajusta el pH del medio a 7.0 y se reparte en matraces de 250 ml a razón de 30 ml. Se tapan éstos y se esterilizan durante 20 minutos a 121°C. Después de esterilizar se mide el fosfato soluble en uno de los matraces, obteniéndose un valor de 100 mg/l.

A modo de ejemplo, y para ilustrar los resultados de la fermentación n° 1 mostrada en la Tabla I, se adicionó a cada matraz 0.5 ml de una solución de hidróxido cálcico al 0.5%. Después de la adición se volvió a valorar el nivel de fosfato soluble en uno de los matraces, obteniéndose ahora una valor de 18 mg/l, que es con el que se llevó a cabo dicha fermentación n° 1.

El medio de fermentación así preparado y sembrado se incuba a 25°C en un agitador rotatorio de 5 cm de excentricidad a 250 rpm. A las 96 horas de incubación la producción de ácido clavulánico obtenido fue de 420 µg/ml HPLC.

E J E M P L O 2 (Comparativo)

Se procede igual que en el caso del Ejemplo 1 pero no se efectúa la adición de hidróxido cálcico. De esta forma se lleva a cabo la fermentación en un medio con 100 mg/l de fosfato soluble. A las 96 horas de incubación la producción de ácido clavulánico fue de 790 µg/ml HPLC (ver fermentación n° 2 de la Tabla I).

E J E M P L O 3

Se procede igual que en el caso del Ejemplo 1 pero en este caso no se lleva a cabo la adición de hidróxido cálcico, y se incluye en la fórmula del medio de fermentación un 0.12% de fosfato monopotásico añadido antes de ajustar el pH. Se valora el fosfato soluble de un matraz después de la esterilización, y se comprueba que se lleva a cabo la fermentación en un medio con 900 mg/l de fosfato soluble. A las 96 horas de incubación la producción de ácido clavulánico fue de

2210µg/ml HPLC (ver fermentación nº 3 de la Tabla I).

E J E M P L O 4

Se procede igual que en el Ejemplo 3 pero en este caso se incluye en la fórmula un 0.21% de fosfato monopotásico. Se valora el fosfato soluble de un matraz después de la esterilización, y se comprueba que se lleva a cabo la fermentación en un medio con 1580 mg/l de fosfato soluble. En este caso se determinó también el fosfato total, obteniéndose un valor de 2380 mg/l, como puede verse en la Tabla II. A las 96 horas de incubación la producción de ácido clavulánico fue de 2240 µg/ml HPLC (ver fermentación nº 4 de la Tabla I).

E J E M P L O 5

Se procede igual que en el Ejemplo 3 pero en este caso se incluye en la fórmula un 0.4% de fosfato monopotásico. Se valora el fosfato soluble de un matraz después de la esterilización, y se comprueba que se lleva a cabo la fermentación en un medio con 3000 mg/l de fosfato soluble. A las 96 horas de incubación la producción de ácido clavulánico fue de 1750 µg/ml HPLC (ver fermentación nº 5 de la Tabla I).

E J E M P L O 6 (Comparativo)

Se procede igual que en el caso del Ejemplo 3 pero en este caso se incluye en la fórmula un 0.95% de fosfato monopotásico. Se valora el fosfato soluble de un matraz después de la esterilización, y se comprueba que se lleva a cabo la fermentación en un medio con 7000 mg/l de fosfato soluble. A las 96 horas de incubación la producción de ácido clavulánico fue de 780 µg/ml (ver fermentación nº 6 de la Tabla I).

E J E M P L O 7 (Comparativo)

El procedimiento es el mismo del Ejemplo 3, pero en este caso se incluye en la fórmula 0.245% de fosfato cálcico tribásico (no se incluye fosfato monopotásico). Se valora el fosfato soluble de un matraz después de la esteriliza-

ción, obteniéndose el resultado de 230 mg/l de fosfato soluble. En este caso se determinó también el fosfato total, siendo el resultado 2265 mg/l (ver fermentación nº 7 de la Tabla II). Después de 96 horas de incubación la producción de ácido clavulánico fue de 920 µg/ml HPLC.

E J E M P L O S 8 a 18 (Ver Tabla IV)

Se prepara un medio de inóculo con la misma composición que el descrito en el Ejemplo 1, y se reparte en matraces Erlenmeyer de 2000 ml con 500 ml de medio. Se tapan y se esterilizan los matraces a 121°C durante 20 minutos.

Una vez efectuada la siembra con una suspensión de esporas semejante a la del Ejemplo 1, se incuba el medio durante 2 días a 25°C en un agitador rotatorio de 5 cm de excentricidad a 250 rpm.

Se toman 400 ml de este cultivo y se usan para sembrar un tanque con 150 litros del siguiente medio:

- Harina de soja	-	2	g
- Dextrina	-	2	g
- Fosfato monopotásico	-	0.04	g
- Aceite de soja	-	0.1	g
- Antiespumante UCON (Polialquilenglicol)	-	0.1	g
- Agua	c.s.p.	100	ml

Se ajusta el pH del medio a 7.3 y se esteriliza a 121°C durante 20 minutos. La incubación se lleva a cabo a 28°C durante unas 30 horas, con una agitación de 115 rpm, una aireación de 0.5 v/v/min y 1 kg/cm^2 de presión en cúpula.

Se toman 45 litros de cultivo incubado en las anteriores condiciones y se transfieren a un tanque con 450 litros del siguiente medio:

- Harina de soja	-	4	g
- Dextrina	-	2	g
- Aceite de soja	-	0.1	g

- Antiespumante UCON - 0.1 g
- Cloruro magnésico - 0.02 g
- Cloruro férrico - 0.003 g
- Cloruro cálcico - 0.01 g
- Agua c.s.p. 100 ml

Se ajusta el pH del medio a 7.0 y se esteriliza a 121°C durante 20 minutos. Después de esterilizar se mide el fosfato soluble, que en este caso da un resultado de 200 mg/l a 300 mg/l. Si es necesario, con objeto de obtener diferentes concentraciones iniciales, se ajusta este valor por adición de volúmenes apropiados de solución de fosfato monopotásico al 1% (ejemplos 10, 11, 12, 14, 15 y 16) o con un compuesto de calcio (ejemplo 8 donde se procedió a la adición del volumen adecuado de una solución de $Ca(OH)_2$). Una vez ajustado el fosfato soluble se hace la transferencia de los 45 litros del cultivo siembra, y se comienza la fermentación. Esta se lleva a cabo manteniendo una temperatura constante de 25°C, 115 rpm, 0.5 v/v/min durante las primeras 24 horas y 1.5 v/v/min desde 25 horas hasta el final de la fermentación, y bajo 0.5 kg/cm^2 de presión en cúpula.

Las diferentes concentraciones de fosfato soluble a lo largo de la fermentación se obtuvieron por adición de distintos volúmenes de una solución estéril de fosfato monopotásico al 1% (ejemplos 13 a 18).

Se efectúa un control automático del pH para mantenerlo entre 6.8 y 7.2 Se realizan además las siguientes adiciones:

- Aceite de soja: 100 ml/h desde las 10 hasta las 120 horas.
- Glicerol al 33%: 400 ml/h desde las 32 hasta las 120 horas.
- Fosfato monopotásico 1%: 400 a 1400 ml/h desde 0 a 25 horas y 1500 a 5000 ml/h desde 25 a 50 horas.

Después de 120 h. de incubación la producción de ácido clavulánico varía entre 990 y 4020 µg/ml, de acuerdo con la Tabla IV.

E J E M P L O 19

La preparación de los medios y establecimiento de las condiciones de fermentación se realiza como en los ejemplos 8 a 18 (Tabla IV), pero se incluyó en el ciclo inicial una concentración de dextrina de 34 g/l. La adición de glicerol se suprimió y se suministró sólo Weichol 92 (Triglicérido sintético con un 60% de ácido oleico, fabricado por Industria Química Lassem) y fosfato monopotásico al 1% con los siguientes programas de adición:

Weichol-92	100 ml/h desde las 10 h. hasta las 120 h
Fosfato monopotásico (1%)	400 a 1400 ml/h de 0 a 25 h y 1500 a 5000 ml/h de 25 a 50 h.

E J E M P L O 20

Se procede igual que en el ejemplo 19 pero se sustituye la adición del triglicérido sintético Weichol-92 por aceite de soja.

E J E M P L O 21

Se procede igual que en el ejemplo 19, pero se alarga la fermentación hasta 172 h, estableciéndose el sistema continuo con extracciones de caldo total desde las 100 h de fermentación con una proporción del 2,5% del caldo extraído cada 24 h en relación al volumen inicial del fermentador después de estéril.

Se dan adiciones de glicerol (33%), Priolube (Trioleato de glicerol fabricado por Unichenta) y fosfato monopotásico (1%) según los programas:

Priolube	100 ml/h de 10 h. a final.
Glicerol (33%)	400 ml/h de 32 h a final.
Fosfato monopotásico (1%)	400 a 1400 ml/h de 0 a 25 h y 1500 a 5000 ml/h de 25 a 50 h.

E J E M P L O 22

Se procede como en el ejemplo 21 pero la fermentación sólo se alarga hasta 150 h y la extracción de caldo se hace en una proporción del 9% cada 24 h. Las adiciones se modifican según los programas:

Priolube	100 ml/h de 10 h a 100 h
	200 ml/h de 100 h a final.
Glicerol (33%)	420 ml/h de 32 h a 100 h
	780 ml/h de 100 h a final
Fosfato monopotásico (1%)	400 a 1400 ml/h de 0 a 25 h
	1500 a 5000 ml/h de 25 a 50 h
	300 ml/h de 50 a final
Agua estéril	312 ml/h de 32 a 100 h
	625 ml/h de 100 h a final

E J E M P L O 23

Se procede como en el ejemplo 22. La fermentación se alarga a 172 h con una extracción del 14% cada 24 h. Además se incluye un programa de adición de agua estéril para mantener el nivel de viscosidad bajo.

Priolube	130 ml/h de 10 h a 100 h
	240 ml/h de 100 h a final.
Glicerol (33%)	515 ml/h de 32 h a 100 h
	960 ml/h de 100 h a final
Fosfato monopotásico (1%)	400 a 1400 ml/h de 0 a 25 h
	1500 a 5000 ml/h de 25 a 50 h.
	300 ml/h de 50 a final
Agua estéril	630 ml/h de 32 a 100 h
	1260 ml/h de 100 h a final

E J E M P L O 24

Se procede como en el ejemplo 23, pero el medio inicial de fermentación está incrementado un 30% en todas sus

materias primas. La fermentación alcanza 155 h y la extracción realizada es del 14% cada 24 h. Los programas de adición utilizados son:

Priolube	130 ml/h de 10 h a 100 h
	240 ml/h de 100 h a final.
Glicerol (33%)	515 ml/h de 32 h a 100 h
	960 ml/h de 100 h a final
Fosfato monopotásico (1%)	400 a 1400 ml/h de 0 a 25 h
	1500 a 5000 ml/h de 25 a 50 h.
	300 ml/h de 50 a final
Agua estéril	630 ml/h de 32 a 100 h
	1260 ml/h de 100 h a final

E J E M P L O 25

Se procede como en el ejemplo 21. La fermentación se alarga hasta 150 h y se realizan extracciones en una porción del 9% cada 24 h. Se elimina por completo la adición de glicerina y se incrementó la adición del triglicérido Priolube. Las adiciones de fosfato y agua estéril son idénticas a las del ejemplo 22. La adición de priolube fue según el siguiente programa:

Priolube	320 ml/h de 10 a 100 h.
	590 ml/h de 100 a final.

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento de producción de ácido clavulánico y/o sus sales mediante cultivo de Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 o de mutantes obtenidos del mismo, en fermentación sumergida con aireación y agitación, en cultivo en lotes, semi-continuo o continuo, en el que las concentraciones de fosfato soluble se fijan al inicio y/o mantienen a lo largo de la fermentación, dentro de unos determinados valores.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración establecida de fosfato soluble presente en el medio al inicio de la fermentación, en el cultivo en lotes, se fija, en un rango comprendido entre 500 y 4000 mg/l.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración establecida de fosfato soluble presente en el medio al inicio de la fermentación, en el cultivo semi-continuo o continuo, se fija, en un rango comprendido entre 150 y 600 mg/l, y/o se mantiene dentro de un determinado rango, preferentemente de 20 a 150 mg/l, a lo largo de la misma.

4.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las concentraciones de fosfato soluble presentes en el medio de cultivo se fijan al inicio y/o se mantienen a lo largo de la fermentación mediante adición de un ión de fosfato soluble, en cualquiera de sus formas, a dicho medio de cultivo.

5.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las concentraciones de fosfato soluble presentes en el medio de cultivo se fijan al inicio y/o se mantienen a lo largo de la fermentación mediante precipitación de dicho fosfato soluble, si éste excede de los límites deseados.

6.- Un procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho fosfato soluble se precipita me-

diante la adición de un compuesto de calcio al medio de cultivo.

7.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se emplea una fuente de carbono que consiste en uno o más triglicéridos, naturales o sintéticos, que son añadidos al comienzo de la fermentación y/o a lo largo de la misma.

8.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por emplear como fuente de carbono exclusivamente uno o más triglicéridos naturales o sintéticos, que son añadidos al comienzo de la fermentación y/o a lo largo de la misma.

9.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 20-40°C.

10.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 22 a 30 °C.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6 C12P17/18 // (C12P17/18, C12R1:465)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. ROMERO ET AL.: "Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in Streptomyces clavuligerus" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 20, 1984, pages 318-325, cited in the application see the whole document	1,9,10
A		2-4
X	AHMED LEHIBRI ET AL.: "Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by Streptomyces clavuligerus" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Vol. 26, 1987, pages 130-135, cited in the application see the whole document	1,9,10
A		2-4
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 January 1997 (27.01.97)	11 February 1997 (11.02.97)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00215

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	AT 400846 A (FERMIC S.A.) 25 March 1996 (25.03.96) see the whole document	1,2,4,7,9,10
X	GB 1508977 A(BEECHAM GROUP LIMITED) 26 April 1978 (26.04.78) see pages 5 , line 49 - page 6, line 44; examples	1,2,4,7,9,10
X	ES 8405439 A (ISTITUTO BIOCHIMICO ITALIANO) 16 September 1984 (16.09.84) see the whole document	1,2,4,7,9,10
X	ES 8602943 A (ANTIBIOTICOS S.A.) 16 March 1986 (16.03.86) see the whole document & EP 0182522 A cited in the application	1,2,4,7,9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/ES 96/00215

Patent document cited in search report	Publication date	Patent familiy member(s)		Publication date
AT-A-400846	25-03-96	AT-A-	40594	15-08-95
GB-A-1508977	26-04-78	AR-A-	206627	06-08-76
		AR-A-	216430	28-12-79
		AR-A-	219050	31-07-80
		AT-B-	350718	11-06-79
		AT-B-	353407	12-11-79
		AT-B-	350719	11-06-79
		AT-B-	348124	25-01-79
		AT-B-	352270	10-09-79
		AU-B-	499171	05-04-79
		AU-A-	8017775	21-10-76
		BE-A-	827926	14-10-75
		CA-A-	1059050	24-07-79
		CA-A-	1055395	15-05-79
		CA-A-	1074325	25-03-80
		CA-A-	1076120	22-04-80
		CH-A-	629252	15-04-82
		CH-A-	630631	30-06-82
		CY-A-	1078	27-12-80
		DE-A-	2517316	23-10-75
		DE-A-	2559410	23-09-76
		DE-A-	2559411	21-10-76
		DE-C-	2560074	28-03-85
		EG-A-	12445	31-12-78
		FR-A-	2267778	14-11-75
		HK-A-	54780	03-10-80
		JP-C-	1054511	23-07-81
		JP-A-	53002494	11-01-78
		JP-B-	55049830	15-12-80
		JP-C-	1054512	23-07-81
		JP-A-	53002495	11-01-78
		JP-B-	55049831	15-12-80
		JP-C-	1054513	23-07-81
		JP-A-	53003588	13-01-78
		JP-B-	55049832	15-12-80
		JP-C-	1054514	23-07-81
		JP-A-	53003589	13-01-78
		JP-B-	55049833	15-12-80
		JP-A-	53003590	13-01-78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/ES 96/00215

Patent document cited in search report	Publication date	Patent familiy member(s)	Publication date
GB-A-1508977		JP-C- 872874	29-07-77
		JP-A- 50142789	17-11-75
		JP-B- 52001996	19-01-77
		JP-C- 916304	15-08-78
		JP-A- 50142591	17-11-75
		JP-B- 52046957	29-11-77
		JP-C- 1008055	31-07-80
		JP-A- 52085189	15-07-77
		JP-B- 54043520	20-12-79
		KE-A- 3076	03-10-80
		LU-A- 72322	20-08-75
		NL-A,B,C 7504621	22-10-75
ES-A-8405439		NONE	
ES-A-8602943		NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 96/00215

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP[6] C12P17/18 // (C12P17/18, C12R1:465)
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP[4] C12P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	J. ROMERO ET AL.: "Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in Streptomyces clavuligerus" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Vol. 20, 1984, páginas 318-325, citado en la solicitud	1,9,10
A	Ver el documento completo	2-4
X	AHMED LEHIBRI ET AL.: "Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by Streptomyces clavuligerus" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Vol. 26, 1987, páginas 130-135, citado en la solicitud	1,9,10
A	Ver el documento completo	2-4

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" documentos anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del Informe de Búsqueda Internacional
27 Enero 1997 (27.01.97)	11 Febrero 1997 (11.02.97)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. nº de fax +34 1 3495304	Funcionario autorizado ANA POLO nº de teléfono +34 1 3495475

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (julio 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº PCT/ES 96/00215

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pasajes relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren
P,X	AT 400846 A (FERMIC S.A.) 25.03.96 Ver el documento completo	1,2,4,7,9,10
X	GB 1508977 A (BEECHAM GROUP LIMITED) 26.04.78 Ver páginas 5, línea 49 - página 6, línea 44; ejemplos	1,2,4,7,9,10
X	ES 8405439 A (ISTITUTO BIOCHIMICO ITALIANO) 16.09.84 Ver el documento completo	1,2,4,7,9,10
X	ES 8602943 A (ANTIBIOTICOS S.A.) 16.03.86 Ver el documento completo & EP 0182522 A citado en la solicitud	1,2,4,7,9,10

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°
PCT/ES 96/00215

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
AT-A-400846	25-03-96	AT-A-	40594	15-08-95
GB-A-1508977	26-04-78	AR-A-	206627	06-08-76
		AR-A-	216430	28-12-79
		AR-A-	219050	31-07-80
		AT-B-	350718	11-06-79
		AT-B-	353407	12-11-79
		AT-B-	350719	11-06-79
		AT-B-	348124	25-01-79
		AT-B-	352270	10-09-79
		AU-B-	499171	05-04-79
		AU-A-	8017775	21-10-76
		BE-A-	827926	14-10-75
		CA-A-	1059050	24-07-79
		CA-A-	1055395	15-05-79
		CA-A-	1074325	25-03-80
		CA-A-	1076120	22-04-80
		CH-A-	629252	15-04-82
		CH-A-	630631	30-06-82
		CY-A-	1078	27-12-80
		DE-A-	2517316	23-10-75
		DE-A-	2559410	23-09-76
		DE-A-	2559411	21-10-76
		DE-C-	2560074	28-03-85
		EG-A-	12445	31-12-78
		FR-A-	2267778	14-11-75
		HK-A-	54780	03-10-80
		JP-C-	1054511	23-07-81
		JP-A-	53002494	11-01-78
		JP-B-	55049830	15-12-80
		JP-C-	1054512	23-07-81
		JP-A-	53002495	11-01-78
		JP-B-	55049831	15-12-80
		JP-C-	1054513	23-07-81
		JP-A-	53003588	13-01-78
		JP-B-	55049832	15-12-80
		JP-C-	1054514	23-07-81
		JP-A-	53003589	13-01-78
		JP-B-	55049833	15-12-80
		JP-A-	53003590	13-01-78

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud internacional Nº PCT/ES 96/00215

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
GB-A-1508977		JP-C- 872874	29-07-77
		JP-A- 50142789	17-11-75
		JP-B- 52001996	19-01-77
		JP-C- 916304	15-08-78
		JP-A- 50142591	17-11-75
		JP-B- 52046957	29-11-77
		JP-C- 1008055	31-07-80
		JP-A- 52085189	15-07-77
		JP-B- 54043520	20-12-79
		KE-A- 3076	03-10-80
		LU-A- 72322	20-08-75
		NL-A,B,C 7504621	22-10-75
ES-A-8405439		NINGUNO	
ES-A-8602943		NINGUNO	